

Aus dem Institut für Arzneimittel
des Bundesgesundheitsamtes
Abteilung für klin. und experimentelle Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. Günther Stille

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANALGETISCHE WIRKSAMKEIT VON BUTORPHANOL UND NEFOPAM SOWIE DEREN HAUPTMETABOLITE

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

HANS - JOACHIM KIRCHHERR

Berlin

1984



Referent : Prof. Dr. W. Christ

Korreferent : Prof. Dr. H. Coper

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. November 1984

1.	Einleitung.....	1
2.	Antinociceptive bzw. analgetische Wirkung von Butorphanol nach Vorbehandlung der Tiere mit Aminophenazon, Phenylbutazon und Metyrapon.....	4
2.1.	Material und Methoden	
2.2.	Ergebnisse	
2.2.1.	Ergebnisse auf der Hote-plate	
2.2.2.	Ergebnisse im Writhing-Test	
2.3.	Diskussion	
3.	Vergleich der analgetischen Wirkung von Butorphanol, Nefopam, N-Desmethylnefopam und Tilidin....	17
3.1.	Ergebnisse	
3.2.	Diskussion	
4.	Effekt von Butorphanol, Hydroxy-Butorphanol und Norbutorphanol nach intraventrikulärer Anwendung..	19
4.1.	Material und Methoden	
4.2.	Ergebnisse	
4.3.	Diskussion	
5.	Antagonismus mit Naloxon: Intraventrikuläre Gabe von Butorphanol nach vorheriger systemischer Gabe von Naloxon.....	26
5.1.	Ergebnisse	
5.2.	Diskussion	
6.	Effekt von Nefopam und N-desmethylnefopam nach intraventrikulärer Gabe.....	29
6.1.	Ergebnisse	
6.2.	Diskussion	
7.	Abschließende Diskussion.....	30

Substanzen

Tevo-3, 14-dihydroxy-N-(cyclobutylmethyl)-morphinan
= Butorphanol

3,14-dihydroxy-N-(trans-3'-hydroxycyclobutylmethyl)
- morphinan = Hydroxybutorphanol

3,14-dihydroxymorphinan = Norbutorphanol
N-dealkyliertes Butorphanol)

Butorphanol Tartrat (mol. wt. 478.58; freie Base mol.wt. 328.48) Hydroxybutorphanol Tartrat (mol. wt.: 494.58) und N-dealkyliertes Butorphanol Tartrat (mol.wt.: 410.58) wurden freundlicherweise von der Firma Bristol-Myers Comp., New York, U.S.A. zur Verfügung gestellt.

Die oben erwähnten Substanzen wurden dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft. Es zeigte sich, daß sie chromatographisch rein waren. Chromatogramme (Kieselgel beschichtete Fertigplatten) wurden im folgenden Fließmittelsystem entwickelt:

Chloroform / Methanol / Dimethylamin (90/10/5 ; V/V). -
Folgende R_f-Werte wurden bestimmt: für Butorphanol 0,65, für Hydroxybutorphanol 0,42 und für Norbutorphanol 0,19.

Nefopam HCL = 3,4,5,6 - Tetrahydro - 5 - methyl-
1 - phenyl - 1 H - 2,5 - benzoxazocin-
hydrochlorid.

N-Desmethyl-Nefopam-HCL = 3,4,5, 6, - Tetrahydro- 1 - phenyl-
1H - 2,5 - benzoxazocin hydrochlorid

Nefopam HCL (C₁₇ H₁₉ NO HCL, mol.wt.: 289,8) und N-Desmethylnefopam HCL (mol.wt. 275,8) wurden freundlicherweise von Dr. Cronheim Ritzer Laboratories Inc., Northridge, CA 91324, U.S.A. zur Verfügung gestellt.

Phenylchinon (Phenyl-p-benzochinon) wurde bei der Fa. Ferak, Berlin gekauft.

Naloxon Hydrochlorid wurde freundlicherweise von Dr. Ferster von der Firma Endo Laboratories, Inc., Garden City/N.Y., U.S.A. und Cremophor EL von der Firma BASF, Ludwigshafen, Deutschland zur Verfügung gestellt.

Wenn nicht anders spezifiziert, wurden Butorphanol und seine beiden Metabolite als Tartrate eingesetzt. Die Dosisangaben beziehen sich daher auf Tartrate und nicht auf freie Base. Nefopam- und Naloxon-Dosen beziehen sich jeweils auf das Hydrochlorid.

Metyrapon wurde uns freundlicherweise von Dr. W. Theobald von der Firma Ciba-Geigy AG, Basel, Schweiz, zur Verfügung gestellt. 5,5 - Diphenylhydantoin (Na-Salz, Reinheitsgrad I, (mol.wt. 274,3), Phenylbutazon (mol. wt. 308,4) und Aminophenazon Gentisat (4-Dimethylaminosantipyrin (mol. wt. 385,4) waren bei der Firma Sigma Chemie GmbH, München, käuflich erworben worden.

1.

EINLEITUNG

Seit langem ist es ein Ziel der medizinischen Forschung, Analgetika zu finden, die in ihrer analgetischen Wirkungsintensität dem Morphin gleich oder gar Überlegen sind. Zugleich ist man bestrebt, die vom Morphin her bekannten unerwünschten Wirkungen möglichst gering zu halten. Hierbei ist besonders das Abhängigkeitspotential beim Morphin gefürchtet.

In der vorliegenden Arbeit soll die analgetische Potenz von zwei Analgetika untersucht werden, dem Butorphanol und dem Nefopam.

Butorphanol (Stadol), ist ein syntetisches, morphinartiges Analgetikum vom Agonist-Antagonisttyp. In klinischen Versuchen war seine Wirksamkeit 5-fach stärker als Morphin, 40-fach stärker als Pethidin oder 20-fach stärker als Pentazocin. Heel et al (12). Die Substanz hat erstaunlicherweise eine gleich hohe Affinität zu allen drei subspezifischen Opiatrezeptoren (μ -, kappa- und delta-Rezeptoren).

Naloxon ist der bekannteste Morphinantagonist (μ -Antagonist). Durch ihn können Opiate von den Rezeptoren verdrängt werden und von ihm Entzugssymptome ausgelöst werden. Der Antagonist hat eine besonders hohe Affinität zu den μ -Rezeptoren, doch ist seine Affinität zu den delta- und kappa-Rezeptoren immer noch höher als die von Morphin.

Butorphanol ist sowohl enteral sowie auch parenteral wirksam. Bei enteraler Gabe unterliegt Butorphanol einem ausgeprägten First-pass-Metabolismus. Nach oraler Gabe werden ca. 17 % unveränderte Muttersubstanz im Blut gefunden. Im Urin erscheinen ca. 80 % Hydroxybutorphanol und etwa 10 % als N-Desalkyliertes Butorphanol, im weiteren als Norbutorpha-

nol bezeichnet und nur 5 % als unverändertes Butorphanol. (12) Heel et al.

Butorphanol wird offensichtlich überwiegend durch Phase I-Metabolismus inaktiviert.

Im Writhing-Test bei Mäusen scheinen die Metabolite unwirksam zu sein (12) Heel et al.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Beeinflussen Substanzen, die selbst zu einem hohen Prozentsatz hydroxyliert werden, die analgetische Potenz von Butorphanol ? (kompetitive Wechselwirkung bei der Inaktivierung des Butorphanols).
2. Sind Butorphanol und seine Metabolite analgetisch wirksam, wenn man sie direkt intraventrikulär appliziert, so daß sie rasch an Opiatrezeptoren im ZNS gelangen können.
3. Kann Naloxon die Wirksamkeit des Butorphanols reduzieren oder gar aufheben ?

Das zweite in dieser Arbeit untersuchte Medikament, das Nefopam läßt sich hinsichtlich seiner chemischen Struktur keiner der bekannten Analgetikagruppen zuordnen. Es ist im Gegensatz zum Butorphanol eine Substanz, deren analgetische Wirksamkeit rein zufällig entdeckt wurde. (4; Campos et al). Es war ursprünglich als zentrales Muskelrelaxans entwickelt worden. Während der klinischen Erprobung war dann zufällig eine analgetische Wirksamkeit festgestellt worden. Es scheint ein sicheres Analgetikum ohne schwerwiegende Nebenwirkungen zu sein.

Aus diesem Grunde wurde es als Vergleichssubstanz in der Arbeit aufgenommen. Der Mechanismus über welchen Nefopam seine analgetische Wirkung ausübt, ist zur Zeit nicht bekannt. Es ist oral sowie parenteral wirksam. Im menschlichen Körper wurden bisher 7 Metabolite gefunden, u.a. das N-Desmethylnefopam und das Nefopam-N-oxid. Nur 5 % einer Nefopamdosis werden unverändert ausgeschieden.

In dieser Arbeit soll die analgetische Wirkung von Nefopam und seines Metaboliten N-Desmethylnefopam im Writhing-Test mit Ratten untersucht werden, um seine Wirkungsstärke mit der des Butorphanols zu vergleichen. (20) Piercey

2. ANTINOCICEPTIVE BZW. ANALGETISCHE WIRKUNG VON BUTORPHANOL NACH VORBEHANDLUNG DER TIERE MIT AMINOPHENAZON, PHENYLBUTAZON UND METYRAPON

(heiße Platte und Writhing als Test-Modelle).

2.1. Material und Methode

Butorphanol wurde freundlicherweise von den Herren Dr. S.M.S. AMER und F.S. CARUSO von den Bristol-Myers-Laboratoris, Syracuse /N.Y., USA zur Verfügung gestellt. Alle Dosisangaben in der Arbeit beziehen sich auf das Butorphanol-Tartrat, sofern nichts anderes angegeben ist. Heel et al (12) führten Versuche mit Mäusen auf der Hot-plate durch, um die antinociceptive Wirkung von Butorphanol zu testen. Caruso et al (5) beobachteten nach Butorphanolgabe auf der Hot-plate nur eine schwache Wirkung und schlugen den Writhing-Test als den empfindlicheren Schmerztest vor. Daher wurde für diese Arbeit neben dem Hot-plate-Test auch der Writhing-Test als Modell zur Messung von Analgesie gewählt. Bei früheren Versuchen mit Tilidin waren bereits ausführliche Erfahrungen mit der Hot-plate gesammelt worden, so daß hierfür bereits ein standardisiertes Verfahren zur Verfügung stand. (9) L. Ernst.

Die Untersuchung wurde mit weiblichen Ratten vom Stamm Lewis durchgeführt. Das Körpergewicht der Tiere betrug 200 bis 240 g. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von je 5 Tieren in einem Makrolonkäfig Größe I bei konstanter Temperatur von

21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 80 % $\pm$ 5 % und konstantem Tag- Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Bei oraler Gabe einer Testsubstanz wurde jedoch eine 12-stündige Futterkarenz vor dem Versuch eingeschaltet.

Bei der Heizplatte wurde eine Plattentemperatur von 58°C gewählt. Verwendet wurde ein käufliches Gerät der Fa. Rhema, Labortechnik in Hofheim/Taunus, Modell 35. Die Versuchstiere sollten der 58°C warmen Platte aufgesetzt werden und es war Ziel der Untersuchungen, zu sehen wann sich eindeutige Schmerzreaktionen bei den Versuchstieren zeigten. Als Reaktion wurde Lecken der sensiblen Hinterfüße oder das Abspringen der Ratte mit beiden Hinterfüßen gleichzeitig von der Platte gegen die Decke der Hotplate gewertet. Die Zeit, welche vom Aufsetzen auf die Platte bis zum Lecken der Hinterfüße verging, wurde gemessen (Angaben in Sekunden). In der Regel vergingen 8 bis 10 Sekunden bei unbehandelten Kontrolltieren. Um auch den zeitlichen Ablauf der analgetischen Wirksamkeit beurteilen zu können, wurde während eines Meßdurchganges in bestimmten Zeitabständen erneut die Reaktion auf der Hotplate gemessen, und zwar 15, 30, 50, 120 und 180 Minuten nach Injektion des Analgetikums.

Vor Beginn des Versuchsablaufes wurden generell zwei 0-Werte genommen, der erste 60 Minuten, der zweite 15 Minuten vor der i.p. Injektion, um die Stabilität der Basiswerte zu überprüfen. Bei den oralen Interaktionsversuchen wurden Substanzen (z.B. Metyrapon) mit der Schlundsonde zwei Stunden vor der i.p. Injektion des Butorphanols gegeben.

Da die Tiere zunächst auf das Lecken der Hinterfüße trainiert werden mußten, durchliefen sie insgesamt zweimal ein vollständiges Versuchsprogramm wie oben angegeben, das 14 Tage vor den eigentlichen Versuchen begann. Nach einem Meßdurchgang (oder dem Vortraining) hatte jede Gruppe mindestens 5 Tage Ruhe, um eine Schädigung der Haut an den Pfoten auszuschließen. Außerdem sollte der Streß für die Tiere in erträglichem Rahmen bleiben. Alle Tiere bekamen bei den Versuchen nur einmal ein Analgetikum appliziert.

Der Writhing-Test wurde nach den Angaben von Blumberg et al (2) mit Phenylchinon durchgeführt. In den Vorversuchen hatte sich die Injektion von Phenylchinon im Vergleich zu 4 %iger Natrium-Chlorid-Lösung (Methode nach Collier und Schneider (7)) als besser erwiesen.

Bei der i.p. Injektion von Phenylchinon (0,2 mg/ml 5 %igem Äthanol pro 150 g Ratte) traten Abdominalkontraktionen (Writhing) in steil ansteigender und langsam abfallender Häufigkeit bis über zwei Stunden post injektionem auf. Der Gipfel der Häufigkeit lag zwischen 15 und 20 Minuten post injektionem. Es wurde eine Beobachtungsdauer von 30 Minuten gewählt. In diesem Zeitraum traten bei Kontrolltieren durchschnittliche 33 Writhinganfälle auf, nach 30 Minuten traten dann nur noch ein bis zwei Kontraktionen in einem Zeitraum von 5 bis 10 Minuten auf. Die Abdominalkontraktionen waren sehr deutlich und mittels Handzahlwerk gut registrierbar. Gewertet wurde als Abdominalkontraktion (Writhing)

das Einziehen der Flanken und das Absenken des Beckens gegen den Boden, wobei die Hinterfüße in grotesken Drehbewegungen nach hinten oder zur Seite abgespreizt wurden. Das Letztere erwies sich als entscheidendes Kriterium bei der Beurteilung der am Beobachtungskäfig aufrecht stehenden Ratte.

Wenn die Tiere zwar die Flanken einzogen, jedoch die Hinterpfoten noch unter Kontrolle hatten, so wurde dies nicht als Writhing gewertet, da sie im Writhing offensichtlich die Koordination der Bewegung ihrer hinteren Extremitäten verloren hat.

Bei der Methode mit 4 %iger Natrium-Chlorid-Lösung i.p. (nach Collier) traten in den ersten drei bis vier Minuten (!) in schneller Reihenfolge 2 und 4 (!) Abdominalkontraktionen kurz hintereinander auf. Danach verhielten sich die Tiere wieder unauffällig. Hier kann nur eine ja/nein Aussage gemacht werden. Eine halbquantitative Methode zur Beurteilung einer Wirkungsverstärkung bzw. -abschwächung, wie sie bei den vorliegenden Untersuchungen benötigt wurde, war nur beim Phenylchinon-Writhing gegeben.

Bei der Auswertung der Phenylchinon-Writhing-Methode wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen:

1. Phenylchinon wirkt als peritonealer Reizstoff. Der maximale Effekt ist ca. 15 Minuten nach i.p. Applikation erreicht. Erkennbar ist dies an der Häufigkeit der Writhing-Anfälle zu diesem Zeitpunkt.



2. Im Idealfall sollte das analgetische Wirkmaximum des zu untersuchenden Schmerzmittels zeitlich mit dem max. Schmerzreiz des Phenylchinons zusammenfallen.
3. Um Verdünnungseffekte am Injektionsort oder direkte Interaktionen mit dem Phenylchinon zu vermeiden, sollten die Analgetika nicht i.p. injiziert werden.

Beim Butorphanol und Nefopam zeigte sich bei subkutaner Applikation das Wirkungsmaximum etwa 30 Minuten nach Gabe bei einer Wirkungsdauer von 1 1/2 Stunden. Um möglichst eine Synchronisation der Wirkungsmaxima sowohl des Butorphanols als auch des Nefopams mit dem des Phenylchinons zu erreichen, wurden die beiden analgetisch wirksamen Substanzen 15 Minuten vor dem Phenylchinon appliziert. Bei oraler Verabreichung wurden die Analgetika 2 Stunden vor dem Phenylchinon gegeben. Nach Phenylchinongabe wurden die Abdominalkontraktionen eine halbe Stunde lang gezählt. In der Regel traten bei den unbehandelten Kontrolltieren etwa 30 Writhing-Anfälle pro halber Stunde auf. Durch unterschiedliche Analgetika-Dosierung ließ sich die Zahl der Kontraktionen dosisabhängig reduzieren. Als ED 50 wurde die Dosis einer Substanz ermittelt, bei welcher nur 50% der Writhing-Anfälle der Kontrollgruppe erreicht wurden (d.h. ca. 15 Anfälle pro 30 Minuten). Eine ED 90 würde in diesem Falle eine Minderung der Writhing-Aktivität um 90 % hervorrufen. In den Interaktionsstudien wurde üblicherweise die ED 50 der Hauptsubstanz (Butorphanol oder Nefopam) verwendet. Von den oral verabfolgten Substanzen, die die Hydroxylierung beeinflussen sollten, wurde eine Dosis ermittelt, die im Writhing-Test selbst möglichst keine Wirkung hatte, d.h. die die Writhing-Anfälle nur um 10 oder höchstens 20% reduziert. Die Meßergebnisse wurden dann als eine Wirkungsverstärkung inter-

pretiert, wenn sich in der Kombination zweier Substanzen eine Verminderung der Writhing-Anfälle um etwa 80-90 % ergab (ED 90, ED 80). Auf ein Kriterium für korrekte Phenylchinon-Applikation wurde jedoch bei allen Messungen geachtet: Mindestens ein Writhing-Anfall mußte bei den untersuchten Tieren aufgetreten sein, auch wenn dieser erst nach 30 Minuten eintrat. Durch dieses Kriterium sollten solche Tiere von der Auswertung ausgeschlossen werden, bei denen das Phenylchinon versehentlich in den Darm injiziert wurde, da es bei dieser Applikationsart keinen Effekt zeigt.

2.2. Ergebnisse

Wie zu erwarten, gab es bei der Dosisfindung für Butorphanol zwischen den zwei Testmethoden große Unterschiede. Auf der Hot-plate wurde eine antinociceptiv wirksame Dosis von 100 mg Butorphanol pro kg i.p. ermittelt. Bei 120 mg pro kg wurde bereits eine toxische Dosis erreicht, zwei von 10 Ratten verstarben. Bei 80 mg pro kg konnte auf der heißen Platte kein Effekt mehr nachgewiesen werden. Im Writhing-Test wurde eine ED 50 von 0,15 mg Butorphanol pro kg subkutan ermittelt. Bereits eine Dosis von 1 mg pro kg unterdrückte die Writhing-Anfälle vollständig.

In den weiteren Versuchen wurde somit beim Hot-plate-Test mit einer Dosis von 100 mg pro kg Butorphanol i.p., im Writhing-Test mit 0,15 mg pro kg subkutan gearbeitet, d.h. auf der Hot-plate war eine annähernd siebenhunderfache Dosis im Vergleich zum Writhing-Test nötig. Dabei traten bereits Nebenwirkungen auf, wie z.B. starkes Einnässen der Tiere und teilweise (2 von 10 Tieren) sogar kataleptisches Verhalten. Die analgetische Wirkung auf der Hot-plate ließ sich bis 30 Minuten nach Injektion verfolgen. Ab 60 Minuten lagen die Reaktionszeiten bereits nahe dem Kontroll-

bereich. Es handelt sich also um einen kurz anhaltenden Effekt. Die Dauer der Wirkung läßt sich im Phenylchinon-Writhing-Test nicht beurteilen, da das Phenylchinon nur etwa 30 Minuten lang stark wirkt und seine Wirkung danach deutlich nachläßt.

2.2.1. Ergebnisse auf der Hot-plate

Für die Interaktionsstudien wurden zunächst für die Kombinationspartner des Butorphanols Wirkdosen ermittelt, die im Hot-plate-Test keinen Effekt zeigen. So ergab sich, daß 80 mg pro kg Phenylbutazon, gelöst in Aqua dest mit Cremophor im Verhältnis 10:1, keine antinociceptive Wirkung hat. Im Hauptversuch wurde dann Phenylbutazon mittels Schlundsonde appliziert. Nach der Kontrolle der Basiswerte erhielten die Tiere zwei Stunden später 100 mg pro kg Butorphanol i.p. Der antinociceptive Effekt wurde zeitabhängig wie oben beschrieben verfolgt. Die Kontrollgruppe bestand aus fünf Tieren, die Phenylbutazon per os erhalten hatten, jedoch zwei Stunden später nur ein entsprechendes Volumen an 0.9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung i.p. Eine zweite Kontrollgruppe, von ebenfalls fünf Tieren, erhielt nur Kochsalz sowohl oral wie auch i.p. Ferner waren zehn Tiere im Versuch, die nur Butorphanol i.p. erhielten (Positiv-Kontrollgruppen über Butorphanol-Effekt).

<u>Gruppe A:</u>	10 Tiere 80 mg/kg Phenylbutazon p.o. und zwei Stunden später 100 mg/kg Butorphanol i.p.
<u>Gruppe B:</u>	5 Tiere 80 mg/kg Phenylbutazon p.o. und zwei Stunden später 0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung i.p.
<u>Gruppe C:</u>	5 Tiere 0.9%ige Natrium-Chlorid- Lösung p.o. und zwei Stunden später 0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung i.p.
<u>Gruppe D:</u>	10 Tiere 0,9%ige Natrium-Chlorid- Lösung p.o. und zwei Stunden später 100 mg/kg Butorphanol i.p.

Die Tiere, welche nur Phenylbutazon erhalten hatten, zeigten gegenüber der reinen Kontrollgruppe (Gruppe C), einen geringfügig erhöhten antinociceptiven Effekt beim 30-Minuten-Wert.

Die mit Butorphanol und Phenylbutazon behandelten Tiere zeigten gegenüber denen nur mit Butorphanol behandelten Tieren eine leichte Erhöhung der Analgesie beim 15, 30 und 60 Minuten-Wert. Die Meßwerte erreichten das Niveau der Basislinie etwa 120 Minuten nach Butorphanol-Gabe. Siehe Abbildung I.

Annähernd gleich war der Versuchsaufbau mit Aminophenazon. Eine Dosis von 100 mg/kg hatte sich auf der heißen Platte als unwirksam erwiesen. Zehn Ratten erhielten 100 mg/kg Aminophenazon mittels Schlundsonde und zwei Stunden danach 100 mg/kg Butorphanol. Diesmal bestand die Butorphanol-Kontrollgruppe nur aus fünf Tieren, wogegen zehn Tiere Aminophenazon oral und 0.9%ige Natrium-Chlorid-Lösung i.p. bekamen und fünf weitere Tiere nur Kochsalz sowohl oral wie auch i.p.

- Gruppe A: 10 Tiere 100 mg/kg Aminophenazon p.o.
und zwei Stunden später
100 mg/kg Butorphanol i.p.
- Gruppe B: 10 Tiere 100 mg/kg Aminophenazon p.o.
und zwei Stunden später
0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung i.p.
- Gruppe C: 5 Tiere 0,9%ige Natrium-Chlorid-
Lösung p.o.
und zwei Stunden später
0,9%ige Natrium-Chlorid-Lösung i.p.
- Gruppe D: 5 Tiere 0,9%ige Natrium-Chlorid-
Lösung p.o.
und zwei Stunden später
100 mg/kg Butorphanol i.p.

Die Ergebnisse gleichen den Befunden nach Phenylbutazon. Es ergab sich lediglich eine zeitliche Verschiebung des Effektes. So war die Wirkung der Kombination Butorphanol und Aminophenazon beim 15- und 60-Minuten-Meßwert deutlich stärker als die des Butorphanols allein. Beim 30-Minuten-Wert war der Effekt der Kombination fast gleich wie nach Butorphanol allein. Nach 120 Minuten war auch hier die Basislinie erreicht. Siehe Abbildung 2.

Die Kombination 100 mg/kg Butorphanol i.p. mit 100 mg/kg Metyrapon p.o. zwei Stunden vor Butorphanol-Gabe ergab eine deutliche Wirkungsverstärkung und zwar sowohl durch Erhöhung der Analgesie von 15-Minuten-Wert bis 10-Minuten-Wert, sowie auch eine Wirkungsverlängerung bis 120 Minuten. Siehe Abbildung 3.

Die Kombination von Diphenylhydantoin und Butorphanol erwies sich als indifferent. Es konnte keine Wirkungsverstärkung gesehen werden. Der Verlauf der Effekt-Zeit-Kurve nach Gabe der Kombination ist annähernd gleich wie nach Butorphanol alleine. Siehe Abbildung 4.

2.2.2. Ergebnisse im Writhing-Test

Auch die Kombinationspartner Phenylbutazon, Diphenyldantoin, Aminophenazon und Metyrapon zeigten im Writhing-Test schon bei niedrigerer Dosierung als im Hot-plate-Test einen Effekt. Die Substanzen mußten somit geringer dosiert werden, als beim Hot-plate-Test und zwar etwa nur halb so hoch.

Die orale Gabe erfolgte wieder zwei Stunden vor dem Beginn der Messung. Butorphanol wurde aus den früher dargelegten Gründen bei diesen Versuchen subkutan gegeben.

Neben den Tieren, die sowohl oral wie auch subkutan, eine Substanz bekamen, wurden einigen Tieren nur Butorphanol subkutan gegeben. Sie dienten als Kontrolle zur Festlegung der ED 50. In den Vorversuchen konnten nämlich beobachtet werden, daß die ermittelten Werte später sehr gut reproduzierbar waren, sofern man bei der Herstellung der gebrauchsfertigen Phenylchinon-Lösung mit größter Sorgfalt vorging und große Mengen einwog, um etwaige Fehler klein zu halten. Ferner mußte auf eine lichtgeschützte Lagerung der gebrauchsfertigen Phenylchinonlösung geachtet werden, da es durch längere Lichteinwirkungen zu Inaktivierung der Lösung kommen kann.

Es konnte ermittelt werden, daß durch die Kombination von 0,15 mg/kg Butorphanol subkutan und 40 mg/kg Phenylbutazon per os (zwei Stunden vor Butorphanol) die Tiere sich im Beobachtungskäfig normal verhalten und nur ganz vereinzelt Abdominalkrämpfe zeigten.

Siehe dazu Abb. 4 - 7.

Gleiche Ergebnisse konnten mit 50 mg/kg Aminophenazon per os bzw. mit 50 mg/kg Diphenylhydantoin per os jeweils 2 Stunden vor 0,15 mg/kg Butorphanol subkutan erreicht werden. Siehe dazu Abb. 4 - 7.

Keine Analgesiezunahme konnte dagegen in der vorliegenden Arbeit durch die vorherige per orale Gabe von Metyrapon (50 mg/kg) erreicht werden.

Im Writhing-Test konnte eine starke analgetische Wirksamkeit des Butorphanols nachgewiesen werden. Es ist zwanzigmal stärker wirksam als Tilidin, wenn letztes subkutan appliziert wird und 2,5-fach wirksamer, als Tilidin, wenn dieses oral gegeben wird. Der Wirkungseintritt des Butorphanols ist schnell und die Wirkungs-dauer kurz.

Die Versuchsergebnisse zeigten, daß Pharmaka, die selbst durch hydroxylierende Enzymsysteme metabolisiert werden, in der Lage sind, die analgetische Wirksamkeit des Butorphanols synergistisch zu beeinflussen. Diese Ergebnisse konnte durch zwei unterschiedliche Analgesie-Testverfahren verifiziert werden.

2.3. Diskussion

Als Grund für die Wirkungsverstärkung kann als Hypothese eine kompetitive Hemmung der mischfunktionellen Oxidasen diskutiert werden. Im Gegensatz zu Tilidin ist jedoch bei Butorphanol die aktive Muttersubstanz das pharmakodynamisch aktive Prinzip.

Tilidin ist dagegen im strengen Sinne eine pro-drug, welche erst in vivo in den aktiven Metaboliten umgewandelt werden muß.

Ernst (9) konnte zeigen, daß durch Metyrapon der Abbau von Tilidin zu einem wirksamen Metaboliten verhindert wird. Beim Butorphanol verhält es sich genau umgekehrt. Hier kann die gut wirksame Muttersubstanz durch Hemmung der arzneimittelabbauenden Enzyme nur langsamer zu dem offensichtlich unwirksamen Hauptmetaboliten abgebaut werden. Ob Hydroxybutorphanol eine analgetische Restwirkung hat, wurde ebenfalls untersucht. Siehe Seite 19.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, die zwei Testmethoden miteinander zu vergleichen. Im vorliegenden Fall steht es außer Frage, daß unterschiedliche Mechanismen der Schmerzvermittlung unterschiedliche Ergebnisse bei den Testmethoden hervorrufen.

Bezüglich des Butorphanols ließ sich der Writhing-Test besser anwenden als der Hot-plate-Test, da er nur eine niedrige Dosierung des Butorphanols erfordert (was wegen der Nebenwirkungen von Bedeutung ist). Außerdem ist er unempfindlich gegen Umwelteinflüsse. Nachteilig ist, daß er keine oder nur

schlechte Auskunft über die Wirkungsdauer eines Medikamentes gibt. Es besteht außerdem die Gefahr, daß ein zu untersuchender Wirkstoff in direkte pharmakokinetische Wechselwirkung mit dem Phenylchinon tritt und so dessen sehr gleichmäßige (sinus-kurvenartig verlaufende) Wirkung aufhebt, verstärkt oder zeitlich verschiebt. Dies könnte eine Erklärung für das Ergebnis des Versuches mit Butorphanol und Metyrapon sein, wo keine Wirkungsverstärkung auftrat, obwohl dies im Hot-plate-Test der Fall war.

Metyrapon blockiert möglicherweise den Abbau des Phenylchinons in vivo. Wir haben es in diesen Fällen mit drei gleichzeitig verabreichten Substanzen zutun: Analgetikum, Phenylchinon und "Inhibitor".

Warum ein Unterschied in der Wirkung zwischen den zwei angewandten Analgesietests besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Sicher ist eine unterschiedliche Schmerzintensität und auch eine andere Schmerzqualität dafür mit verantwortlich.

3. VERGLEICH DER ANALGETISCHEN WIRKUNG VON BUTORPHANOL, NEFOPAM, N-DESMETHYLNEFOPAM UND TILIDIN

Da Nefopam anders als Butorphanol nicht an den Morphinrezeptoren angreift, sollte es neben Tilidin, das ausschließlich an den Morphinrezeptoren wirkt, als Vergleichssubstanz zum Butorphanol ebenfalls mit Hilfe des Writhing-Tests untersucht werden. Auch die Tiere und deren Haltung wurde bereits in Kapitel 2.1. erläutert.

3.1. Ergebnisse:

Butorphanol erwies sich im Writhing-Test dem Tilidin und Nefopam überlegen. Subkutan war Butorphanol in einer etwa 20-fach geringeren Dosis gleich wirksam wie Tilidin und in einer 80-fach geringeren Dosis gleich wirksam wie Nefopam.

Oral war Butorphanol in einer 2,4-fach kleineren Dosis gegenüber Tilidin und in einer 16-fach kleineren Dosis gegenüber dem Nefopam wirksam.

Tabelle:

		<u>Subkutan-Gabe</u>	<u>orale Gabe</u>
Butorphanol	ED 50	0,15 mg/kg	1,25 mg/kg
Tilidin	ED 50	3,00 mg/kg	3,00 mg/Kg
Nefopam	ED 50	12,00 mg/kg	20,00 mg/Kg

Außerdem wurden Versuche mit N-Desmethylnefopam, welches sowohl subkutan als auch oral verabreicht wurde, unternommen. Bei beiden Applikationsarten erwies sich der Metabolit zur Muttersubstanz als nahezu gleich stark analgetisch wirksam. (Vgl. Tabelle).

Tabelle:

	<u>ED 50 N-Desmethylnefopam</u>	<u>ED 50 Nefopam</u>
Subkutan	15,00 mg/kg	12,00 mg/kg
Oral	30,00 mg/kg	20,00 mg/kg

3.2.

Diskussion:

Es zeigte sich, daß Butorphanol im Phenylchinon-Writhing-Test bei der Ratte von den hier untersuchten Substanzen am stärksten wirksam ist.

Anders als auf der Heizplatte, wo Tilidin in Größenordnungen von 60 mg/kg angewandt wurde und eindeutig besser wirksam ist als Butorphanol. Ernst (9).

Im Gegensatz zu den beiden anderen Opioiden, wo entweder nur die Muttersubstanz oder nur der Metabolit wirksam ist, besitzt beim Nefopam sowohl die Muttersubstanz als auch der Hauptmetabolit analgetische Wirksamkeit. In welchem Ausmaß die einzelnen Komponenten - Nefopam und N-Desmethylnefopam - zur Gesamtwirkung beitragen, läßt sich mit den hier verwendeten Testmodellen nicht bestimmen.

4. EFFEKT VON BUTORPHANOL, HYDROXY-BUTORPHANOL UND NORBUTORPHANOL NACH INTRAVENTRIKULÄRER APPLIKATION

Es liegen viele Arbeiten vor, die sich mit der Lokalisation und Dichte von Morphin-Rezeptoren im ZNS befassen. (14), (15), (17), (25), (1).

Eine besonders hohe Dichte ist im Nucleus candatus und im Putamen nachgewiesen. (Atweh and Kuhar, 1977) (1). Von dem lateralen Ventrikel können die zu prüfenden Substanzen in periventrikuläres Gewebe wie z.B. den Nucleus candatus penetrieren.

Durch eine Kanüle, welche in einen der Seitenventrikel implantiert ist, ist es daher möglich Substanzen in die Nähe der Opiat-Rezeptoren zu bringen.

4.1. Material und Methode

Als Versuchstiere dienten weibliche Lewisratten von 140 bis 160 g Körpergewicht. Die Tiere wurden in Gruppen von je 20 Tieren eingeteilt und zu je 5 Tieren in einem Makrolon-Käfig gehalten. Der Raum war voll klimatisiert mit einer Temperatur von 21°C und $80 \pm 5\%$ Luftfeuchtigkeit. Es bestand ein 12-Stunden-Tag und Nachtrhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Alle Tiere wurden auf 4,5 mm Länge abgesägte Injektionskanülen (Größe 2) in den rechten lateralen Hirnventrikel implantiert. Im wesentlichen wurde die Methode von Ernst (9) übernommen.

Die Tiere wurden mit Chloralhydrat (300mg/kg i.p.) narkotisiert und das Kopffell glatt rasiert. Danach wurden sie im stereotaktischen Gerät fixiert. Durch einen medianen Kopflängsschnitt wurde der Schädelknochen freipräpariert. Mit an Gummibändern aufgehängten Wundhakchen wurden die Wundränder gespreizt

und ca. 0,5 mm angehoben. Danach wurde das Bregma aufgesucht und das Loch für einen Zugang zum Ventrikel gebohrt und zwar 1 mm lateral und 0,5 mm caudal vom Bregma, ohne die Dura zu durchstoßen (Bohrer 1,2 mm rund). Anschließend wurden zwei weitere Löcher in beide Parietalschuppen gebohrt, in welche anschließend Schrauben der Größe 1,4 x 3 mm eingedeht wurden. Danach wurde die Wunde vom Bohrstaub gesäubert und die vorbereitete Kanüle über das Bohrloch geschwenkt und soweit abgesenkt, daß sie mit der Spitze gerade noch nicht in das Bohrloch eintauchte. Aus dieser Position wurde die Kanüle dann genau 4,5 mm tief in das Gehirn abgesenkt und anschließend mit Zahnzement an der Schädelkalotte und den Schrauben fixiert.

Vor der Fixierung ergibt sich die Möglichkeit, zu kontrollieren, ob die Nadel Anschluß an das Ventrikelsystem hat. Nach der Methode von Paakari (19) wurden vorher an den Implantationskanülen ein 45 cm langer, Polyäthylenschlauch (PE 50) befestigt, mit 0,9%iger Natrium-Chloridlösung gefüllt und am freien Ende mit einer Kocherklemme verschlossen.

Nach Implantation wurde die Klemme geöffnet und der Schlauch vorsichtig angehoben. Wanderte der Flüssigkeitsmeniskus abwärts, so war die Kanüle im Ventrikel plaziert. Kam es zu keinem Absinken des Flüssigkeitsspiegels, so wurde die Kanüle vorsichtig um 1 mm zurückgezogen und das Verfahren so lange wiederholt, bis das Absinken des Flüssigkeitsmeniskus die Verbindung zum Ventrikelsystem anzeigte.

Alle Ratten, die das Versuchsprogramm durchlaufen hatten, wurden eingeschläfert und dekapitiert. In die Ventrikelkanüle war vorher "Berliner Blau" injiziert worden.

Dann wurde das Gehirn herausoperiert und aufgeschnitten, um so die Lage der Kanüle zu kontrollieren. Von 80 Tieren wurde bei dreien das Ventrikelsystem nicht getroffen. Deren Meßwerte wurden ausgetrennt. Jedoch zeigten nahezu alle Tiere starke Vereiterungen im Ventrikelbereich, wenn sie zum Zeitpunkt der Sektion zwölf Tage mit der Kanüle gelebt hatten. Tiere, die bereits am 10. Tag nach der Operation getötet und sezziert wurden, zeigten derartig starke Vereiterungen nicht. Deshalb wurden Versuche nur bis zum 10. Tag nach der Operation durchgeführt.

Es ergab sich daraus folgendes Vorgehen:

Training der Tiere auf der Hot-plate, 5-7 Tage
später Operation. Abermals 5 - 7 Tage später
Versuch auf der Hot-plate, 5 Tage später (jedoch
nie länger als 10 Tage post Operationem) evtl. erneu-
ter Versuch.

Die Injektionen in die Ventrikelkanülen wurden mit einer Kloehn-Mikrospritze von einem Gesamtvolumen von 10 μ l vorgenommen. Die Länge der Injektionsnadel entsprach in ihrer Länge der implantierten Kanüle. Vor der Injektion wurde die eingesetzte Kanüle mit einer ebenfalls gekürzten Kanüle Nr. 17 auf Durchgängigkeit geprüft.

Ursprünglich sollten 5 μ l einer Wirkstofflösung unter 5 μ l einer 0,9%igen Natrium-Chloridlösung aufgezogen und injiziert werden. Doch da es Schwierigkeiten mit der Löslichkeit der Substanzen in den angestrebten Konzentrationsbereichen gab, mußten später 10 μ l der Lösungen mit Wirksubstanz gegeben und auf das Nachspülen mit Natrium-Chlorid verzichtet werden.

Als Testmethoden wurden wieder die Heizplatte und der Writhing-Test angewandt, wie bereits unter 2.1. beschrieben, jedoch mit geänderten Zeitschema. Bei intraventrikulärer Applikation wurde - wegen des schnellen Wirkungseintrittes - der erste Meßzeitpunkt schon 5 Minuten nach Applikation der Lösung gewählt. Die anderen Meßzeitpunkte entsprachen dem vorher aufgeführten Zeitschema: 15, 30, 60 und 120 Minuten.

Im Writhing-Test wurden ebenfalls wegen des schnellen Wirkungseintrittes - diesmal Phenylchinon zuerst i.p. gegeben und 10 Minuten danach das Analgetikum intraventrikulär injiziert, um ein zeitliches Zusammentreffen der Wirkungsmaxima zu erreichen.

4.2. Ergebnisse:

Auch hier mußte im Hot-plate-Test zur Erzielung einer ausgeprägten antinociceptiven Wirkung Butorphanol hoch dosiert werden. Traten bei der i.p. Injektion einer Dosis von 100mg/kg schon kataleptische Verhaltensformen vereinzelt auf, so wurde dies bei der intraventrikulären Injektion um so deutlicher. Beim Versuch, den Tieren 200 µg in 5 µl intraventrikulär zu geben, zeigten alle Tiere kataleptische Erscheinungen. Dabei war der antinociceptive Effekt nicht besonders ausgeprägt. Es blieben beim 5-Minuten-Wert zwar alle Tiere bis 60 sec. auf der Heizplatte, es erscheint jedoch fraglich, ob hierbei Analgesie oder Katalepsie dieses Verhalten verursachte. Beim 15- und 30-Minuten-Wert lagen nur noch mäßig verlängerte Reaktionszeiten vor. Der Versuch,

die Dosis zu reduzieren, ließ zwar bei einer Dosis von 100 µg in 5 µl die Katalepsieerscheinungen verschwinden, jedoch lag auch der analgetische Effekt beim 5-Minuten-Wert nur geringfügig über dem der Kontrollgruppe. Siehe Abb. 8.

Ähnliches ergab sich mit den Metaboliten. Wegen der begrenzten Löslichkeit von Hydroxybutorphanol in Wasser, wurde die Höchstdosis - aus physikalischen Gründen - auf 200 µg beschränkt.

Die Tiere erhielten 200 µg Hydroxybutorphanol HCL in 5 µl aqua bidest intraventrikulär. Wie nach den vorherigen Versuchen zu erwarten war, zeigten die Tiere weder eine Verhaltensänderung noch eine Analgesie.

(Abb. 9.)

Erstaunlicherweise zeigten 4 von 9 Ratten, die 200 µg Hydroxybutorphanol in 10 µl aqua bidest erhalten hatten, ein katalepsieähnliches Verhalten mit Reaktionszeitverlängerung bis 15 Minuten post Injektionem.

(Abb. 10.)

Auf der Heizplatte konnte kein Versuch mit Norbutorphanol unternommen werden, da die zur Verfügung stehende Substanzmenge (ca. 9 mg) für den Writhing-Test reserviert werden mußte, in dem Butorphanol schon bei wesentlich geringeren Dosen eine Wirkung zeigte.

Im Phenylchinon-Writhing-Test konnte die Dosis zwanzigfach niedriger als auf der Heizplatte gewählt werden. Kataleptische Nebenerscheinungen traten nicht auf.

Die Tiere erhielten zunächst 5 µg Butorphanol in 5 µl aqua bidest intraventrikulär. Es kam dabei bereits zu einer deutlichen Reduzierung der Writhing-Anfälle.

Bei 10 µg Butorphanol in 5 µl aqua bidest intraventrikulär wurde bereits die ED 50 geringfügig überschritten. (Abb. 11).

Auch beim Norbutorphanol ergaben sich Schwierigkeiten mit der Löslichkeit. Norbutorphanol-Tartrat war noch schlechter als Hydroxybutorphanol-Tartrat in wäßrigen Medien löslich. Der Versuch eine Norbutorphanol-Tartrat-Lösung mit einer Konzentration 1 µg/ µl in aqua bidest herzustellen, mißlang. Das Resultat war wahrscheinlich eine Suspension. Erst in Form des Hydrochlorids war Norbutorphanol ausreichend löslich.

Gruppen von je 10 Ratten erhielten folgende Lösungen, wobei jedem Tier 10 µl intraventrikulär appliziert wurden:

1. Hydroxybutorphanol 10 µg / 10 µl
2. Hydroxybutorphanol
HCL 10 µg / 10 µl
3. Norbutorphanol HCL 10 µg / 10 µl

Alle drei Substanzen erwiesen sich im Phenylchinon-Writhing-Test eindeutig als unwirksam. (Abb. 11 und 12.)

.3. Diskussion:

Nur mit Hilfe des Writhing-Testes konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß die Butorphanol-Metaboliten Hydroxybutorphanol und Norbutorphanol in gleicher Dosis wie die Muttersubstanz analgetisch unwirksam sind.

Die Versuche auf der Heizplatte deuten zwar ein ähnliches Ergebnis an, das klare Bild wurde jedoch durch die unerwünschten Wirkungen des Butorphanols, wie z.B. Katalepsie und starkes Einnässen sowie Verlust der Feinmotorik verwischt. Diese Erscheinungen wurden von mehreren Autoren beobachtet und beschrieben, wenn stark wirkende Analgetika intraventrikulär gegeben wurden. Ernst (9), z.B. beschrieb sie nach Norpethidin, Watanabe (22) nach Morphin, wobei jeweils vergleichbar hohe Dosen wie in der vorliegenden Arbeit gegeben wurden.

Geringe Substanzmengen konnten derartige Phänomene nur auslösen, wenn sie direkt in die graue Substanz gegeben wurden. So applizierte z.B. Jaquet und Lajtha (15) 10 µg Morphin in die periäquäduktale Substanz und Levy und Proudfit (16) gaben sogar nur 2,5 µg Morphin in die graue Substanz. Überall traten die auch hier beobachteten Nebenwirkungen wie Katalepsie, Einnässen und Verlust der Feinmotorik in den Vordergrund. Eindeutige Aussagen über die analgetische Wirksamkeit einer Substanz lassen sich bei derartigen Nebenerscheinungen nicht mehr machen, zumal auf der Heizplatte erlernte Reflexe als Kriterium der antinociceptiven Wirkung gemessen werden.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Frage zu sein, ob es sich bei den Begleiterscheinungen ausschließlich um agonistische Opiateffekte handelt oder ob auch der antagonistische Teil an diesem Effekt beteiligt ist. Dies soll im nächsten Versuchsaufbau mit Naloxon untersucht werden.

5.

ANTAGONISMUS MIT NALOXON: INTRAVENTRIKULÄRE GABE -
VON BUTORPHANOL NACH VORHERIGER SYSTEMISCHER
GABE VON NALOXON

Das experimentielle Vorgehen ist identisch mit dem in Kapitel 4. 1. beschriebenen.

Mit Hilfe von Naloxon sollten die Morphinrezeptoren im Gehirn der Versuchstiere besetzt werden.

Durch Blockade der μ -Rezeptoren sollte geklärt werden, inwieweit die Wirkung des Butorphanols über die μ -Rezeptoren vermittelt wird.

Naloxon selbst als fast reiner Antagonist besitzt jedoch eine antinociceptive Potenz, wenn es in höherer Dosis gegeben wird. Ernst (9) zeigte, daß 100 mg/kg Naloxon i.p. gegeben bereits einen schwachen antinociceptiven Effekt auf der Heizplatte hatte und zwar bereits 5 Minuten nach der Gabe. Bei 50 mg/kg dagegen konnte kein Effekt mehr nachgewiesen werden.

5.1.

Ergebnisse:

Zunächst wurde wieder der Heizplattentest gewählt, speziell um zu sehen, inwieweit Naloxon die Nebenwirkung des Butorphanols beeinflussen kann.

Naloxon wurde als i.p. Injektion (10 mg/kg Körpergewicht) 15 Minuten vor der intraventrikulären Injektion von Butorphanol in einer Dosierung von 200 μ g/5 μ l gegeben. Es zeigte sich im Effekt-Zeit-Verlauf (Abb. 13) eine starke Senkung des antinociceptiven Effektes, jedoch keine totale Aufhebung. Drei von neun Tieren zeigten kurzzeitig (bis ca. 8 Minuten) nach Butorphanol-Injektion kataleptisches Verhalten. Nach 15 Minuten jedoch verhielten sich alle Tiere normal.

Für den Writhing-Test mußte zunächst eine niedrigere Dosierung des Naloxons ausgetestet werden. Tatsächlich wirkten bereits 10 mg/kg subkutan stark analgetisch. Rechnerisch liegt die ED 50 für Naloxon im Writhing-Test bei 6,3 mg/kg.

Naloxon 1,25 mg/kg subkutan gegeben zeigten keine Wirkung im Writhing-Test mehr. Naloxon wurde in dieser Dosis wieder subkutan 15 Minuten vor der interventrikulären Injektion von Butorphanol gegeben.

0 Min.	Naloxon	1,25 mg/kg	<u>S.c.</u>
5 Min.	Phenylchinon	0,2 mg/ml 5%igem Äthanol pro 150 g Ratte	<u>i.p.</u>
15 Min.	Butorphanol	10 µg/µl	<u>intra- ventri- kulär</u>

Es zeigt sich, daß Naloxon die Butorphanolwirkung abschwächen, jedoch nicht aufheben konnte. Siehe Abb.14

5.2.

Diskussion:

Durch den Antagonismus mit Naloxon konnte nachgewiesen werden, daß der antinociceptive Effekt von Butorphanol zum Teil durch Morphinrezeptoren (μ -Rezeptoren) vermittelt wird. Die Restwirkung ist durch Naloxon nicht aufhebbar. Da Naloxon keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die kataleptischen Nebenwirkungen des Butorphanols zu haben scheint, muß angenommen werden, daß diese bei Butorphanol nicht über die μ -Rezeptoren vermittelt werden. (23) Wilcox

Interessant ist der starke Effekt des Naloxons im Wrihting-Test. Die ED 50 ist annähernd doppelt so groß wie die des Tilidins subkutan gegeben und halb so hoch wie die des Nefopams. (Tabelle 1, Kap. 3.1.). Naloxon ist in diesem Testmodell ein stärkeres Analgetikum als Nefopam. Abb. 15.

6.

EFFEKT VON NEFOPAM UND N-DESMETHYLN-NEFOPAM
NACH INTRAVENTRIKULÄRER GABE

Nefopam und sein N-desmethylierter Metabolit wurden intraventrikulär gegeben, um zu sehen, wie sich eine Substanz verhält, die wahrscheinlich nicht auf Morphinrezeptoren wirkt.

Außerdem wurde der Effekt von Nefopam auch nach Vorbehandlung der Tiere mit 10 mg/kg Naloxon i.p. getestet.

6.1.

Ergebnisse:

Auf der Hot-plate zeigten 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Nefopam intraventrikulär einen gleichen Effekt - Zeitverlauf wie die gleiche Menge Butorphanol intraventrikulär. Diese Wirkung ließ sich beim Nefopam durch Naloxon nicht beeinflussen. Siehe Abb. 16.

Das N-Desmethylnefopam scheint annähernd gleich stark wirksam zu sein, wie die Muttersubstanz. Eine genauere Aussage konnte auf der Heizplatte jedoch nicht getroffen werden, da nur 6 Tiere bewertet werden konnten. Es steht jedoch außer Frage, daß das N-Desmethylnefopam in diesem Test wirksam ist. Siehe Abb. 17. Die auf der Hot-plate gewonnenen Ergebnisse konnten durch den Writhing-Test bestätigt werden.

Nefopam-HCL (100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) bewirken eine gut Analgesie, N-Desmethylnefopam (100 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) zeigte eine etwas schwächere, jedoch deutliche Analgesie. (Siehe Abb. 18).

Auch im Writhing-Test konnte die Nefopamwirkung durch vorherige Gabe von Naloxon nicht antagonisiert werden.

6.2.

Diskussion

Vergleicht man Butorphanol, Tilidin und Nefopam miteinander, so muß folgendes diskutiert werden:

1. Beim Butorphanol scheint nur die unveränderte Muttersubstanz analgetische bzw. antinociceptive Wirkung zu besitzen. Die beiden Metabolite Hydroxybutorphanol und Norbutorphanol sind in den beiden Testmodellen unwirksam, zumindest bei Gabe gleicher Dosen.
2. Bei Tilidin scheint die Muttersubstanz unwirksam zu sein. Es ist wahrscheinlich eine Prodrug, die erst im Körper durch metabolische Umwandlung "aktiviert" werden muß.
3. Beim Nefopam ist der Hauptmetabolit fast gleich gut wirksam wie die Muttersubstanz. In den hier angewandten Test-Modellen läßt sich keine Aussage darüber machen in welchem Maße die einzelnen Substanzen zur Gesamtwirkung beitragen.

7.

ABSCHLIESSENDE DISKUSSION

Auf die in der Einleitung gestellten Fragen lassen sich folgende Antworten geben :

1. Substanzen, die selbst im Körper hydroxyliert werden, können die analgetische Wirkung des Butorphanols beeinflussen. Am Beispiel von schwachen Analgetika, wie z.B. Aminophenazon kann die Wech-

selwirkung im Sinne eines Synergismus interpretiert werden. Durch eine verlangsamte Hydroxylierung des analgetisch wirksamen Butorphanols könnte es zu einer Wirkungsverlängerung bzw. -verstärkung kommen - unabhängig von einer eigenen analgetischen Potenz des Pharmakons, das gleichzeitig gegeben wurde. dies müßte jedoch in Untersuchungen über den Metabolismus des Butorphanols am lebenden Tier erst bewiesen werden.

2. Durch intraventrikuläre Applikation von Hydroxybutorphanol und Norbutorphanol konnte in zwei Testmodellen gezeigt werden, daß diese beiden Hauptmetabolite des Butorphanols analgetisch unwirksam sind.

3. Durch Vorbehandlung mit Naloxon (1,25 mg/kg subkutan) wird im Writhing-Test die Wirkung des Butorphanols um ca. 30 % gesenkt. Dies ist ein Hinweis für die Beteiligung von μ -Rezeptoren an der Wirkung dieses syntetischen Analgetikums. Andererseits gibt dieser Befund einen Hinweis auf die Stellung des Butorphanols zwischen dem reinen Agonisten Morphin und dem Antagonisten Naloxon. Man kann spekulieren, daß der agonistische Teil im Wirkspektrum des Butorphanols geringer als der antagonistische Anteil ist und Butorphanol - anders als der Pentazocin - näher dem Nalorphin steht.

4. Nefopam, das keiner der bekannten chemischen Stoffklassen der starken Analgetika angehört, zeigt im Writhing-Test eine gute analgetische Wirkung.

In diesem Modell zeigte es bei gleicher Dosis ein Viertel der Tilidin-Analgesie.

Unerwartet war der Effekt des N-Desmethylnefopam, das nahezu gleich gut wirksam ist wie die Muttersubstanz und zwar sowohl nach oraler wie nach subkutaner und nach intraventrikulärer Applikation. Da Naloxon seine Wirkung nicht beeinflusst, scheidet eine Wirkung auf die μ -Rezeptoren aus, (vgl. auch Heel et al (12). Trotzdem kommt es bei intraventrikulärer Applikation zu einem schnellen Einsetzen der Analgesie.

Zusammenfassend finden wir zwei sich bezüglich der analgetischen Wirkung der Muttersubstanzen und Metabolite unterschiedlich verhaltende Substanzen. Vergleicht man sie zusätzlich mit einer dritten Substanz, nämlich den Tilidin, so ergeben sich drei verschiedene Gruppen in Bezug auf die analgetische Wirksamkeit.

1. Gruppe - Vertreter Butorphanol:

Muttersubstanz wirksam - Metabolit unwirksam.

2. Gruppe - Vertreter Nefopam :

Muttersubstanz wirksam - Metabolit wirksam.

3. Gruppe - Vertreter Tilidin :

Muttersubstanz unwirksam-Metabolit wirksam.

Abschließend soll noch einmal auf die unterschiedlichen Testmethoden, die Hot-plate und den Writhing-Test eingegangen werden.

Beim Butorphanol konnten im Writhing-Test eindeutige Ergebnisse erzielt werden, wogegen auf der Hot-plate, bedingt durch die hohe am unteren Rand des toxischen Bereiches liegende Dosis, die Ergebnisse durch verstärkte Nebenwirkungen überlagert wurden.

Die Problematik beim Writhing-Test liegt

1. in der möglichen Interferenz des Phenylchinons mit dem zu untersuchenden Pharmakon, was im vorliegenden Fall mit Metyrapon offensichtlich der Fall war, und
2. in der zeitabhängigen Wirkung des Phenylchinons. Als peritoneales Reizmittel hat es annähernd eine sinusförmige Wirkung mit etwas steilerem Anstieg und etwas langsamerem Abfall der Writhing-Intensität. Dies macht eine vorherige Ermittlung des Wirkprofils des zu untersuchenden Pharmakons nötig. Dazu benötigt man beispielsweise eine Testmethode von der Art der Hot-plate oder ein ähnliches Verfahren. Es ist beim Writhing-Test zu erstreben, sowohl das Wirkungsmaximum des Phenylchinons wie der zu untersuchenden Substanzen zeitlich zu synchronisieren. Dies macht einen genauen zeitlichen Fahrplan bei der Gabe der Substanzen (vor - nach Phenylchinon) notwendig. Dies bedeutet, daß der Test für jedes einzelne Problem individuell gestaltet werden muß und mit einem anderen Test, wie z.B. dem Hot-plate-Test kombiniert werden muß.

Ausblick auf künftige Untersuchungen, welche zur Klärung der Hypothesen wünschenswert wären:

Die Befunde zur Wechselwirkung von sogenannten starken (z.B. Butorphanol) und schwachen (z.B. Phenylbutazon) Analgetika in 2 Testmodellen sind rein deskriptiv. Schon die Schlußfolgerungen, daß es auf metabolischer Ebene zu Interaktionen kommen könnte - durch beschleunigten bzw. verlangsamten Abbau der Muttersubstanz - sind bisher nicht bewiesen und daher rein spekulativ.

Es wäre daher notwendig, die in dieser Arbeit erhobenen Befunde und deren Interpretation durch begleitende Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen in Geweben (z.B. Gehirn) und Körperflüssigkeiten zu unterstützen und damit die Spekulationen letztlich zu verifizieren oder zu falsifizieren.

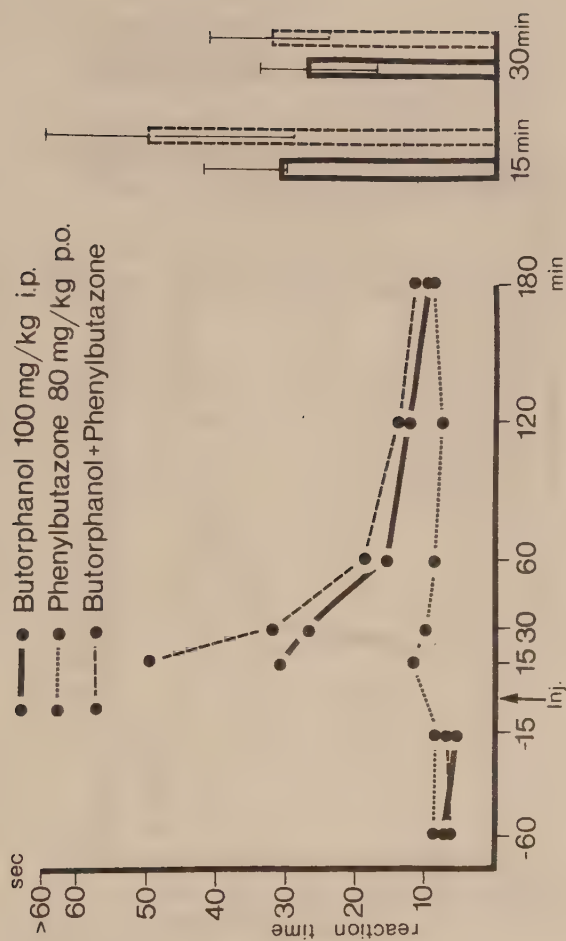
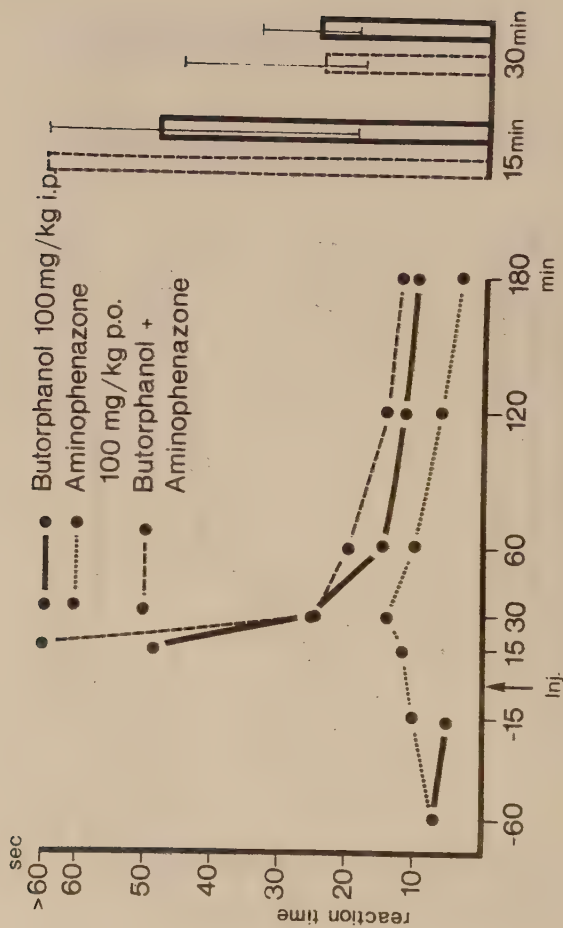


Abb. 1



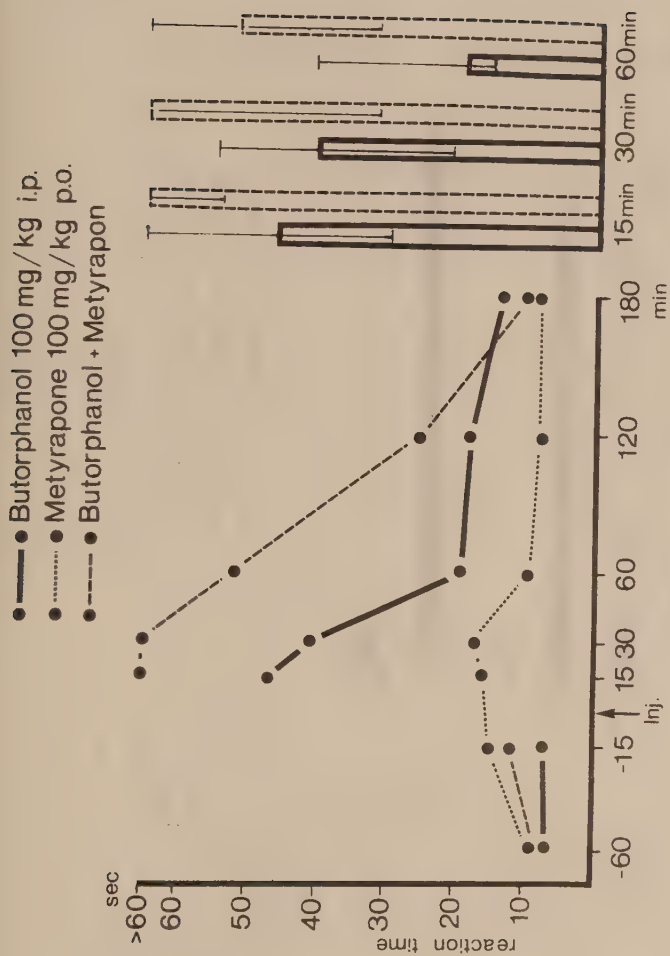


Abb. 3

writhing test (rat)

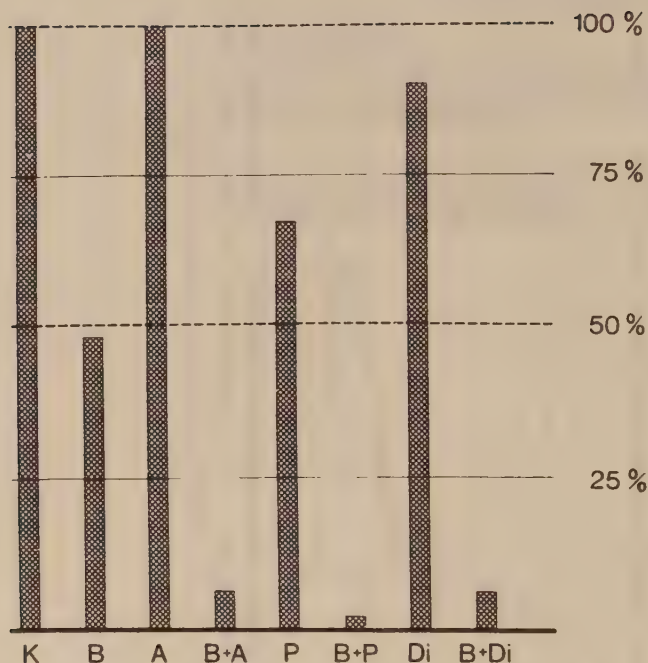
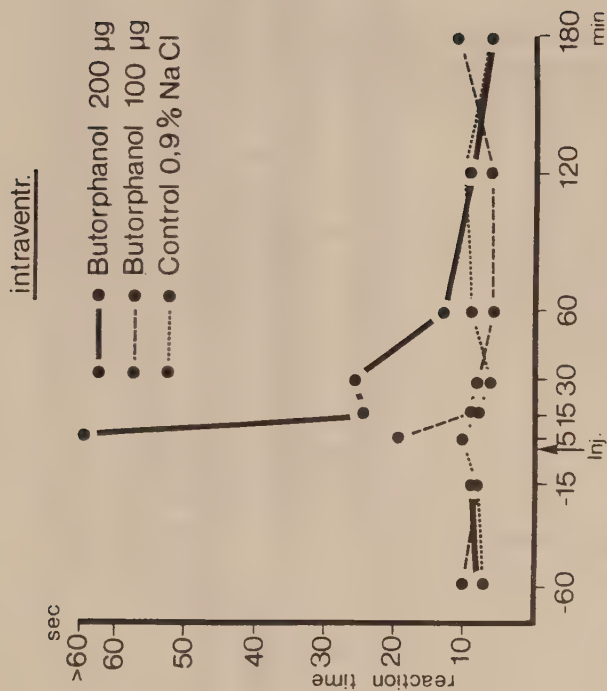
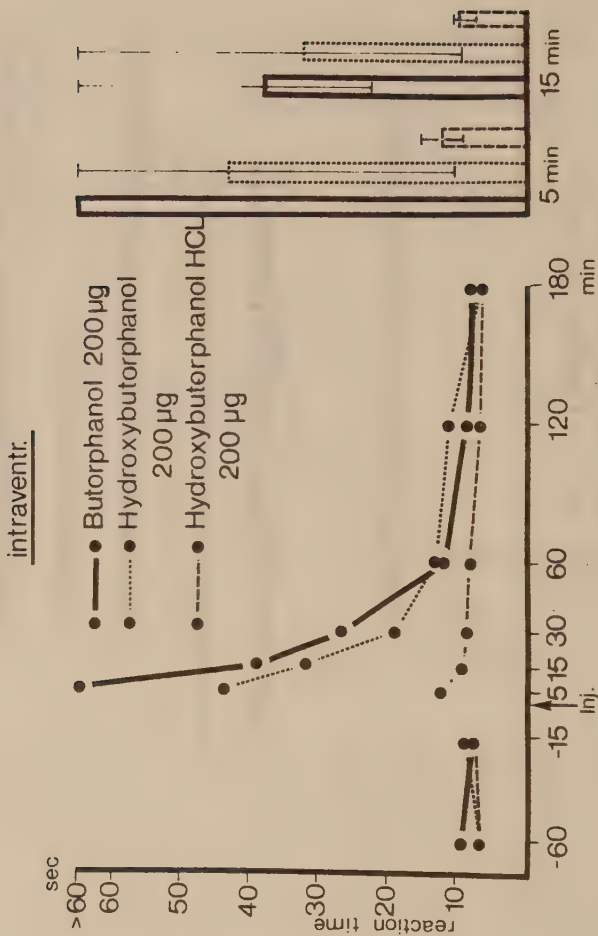


Abb. 4 - 7

Kontrolle: 0,2 mg/150 g

B	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 0,15 mg/kg Butorphanol s.c.
A	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 50 mg/kg Aminophenazon o.o.
B + A	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 0,15 mg/kg Butorphanol s.c.+ 50 mg/kg Aminophenazon o.o.
P	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 40 mg/kg Phenylbutazon o.o.
B + P	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 0,15 mg/kg Butorphanol s.c.+ 40 mg/kg Phenylbutazon o.o.
Di	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 40 mg/kg Diphenylhydantoin o.o.
B + Di	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 0,15 mg/kg Butorphanol s.c.+ 40 mg/kg Diphenylhydantoin o.o.





writhing test (rat)

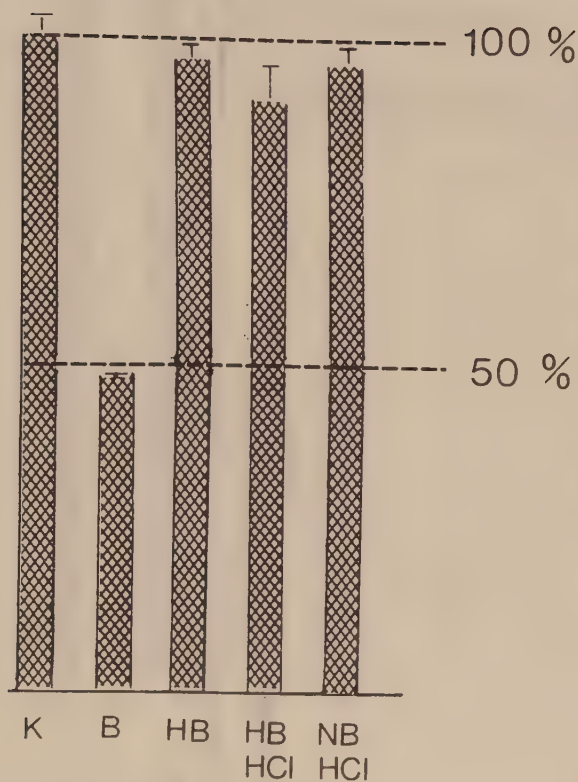
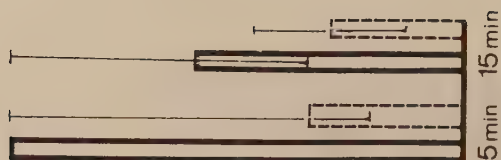
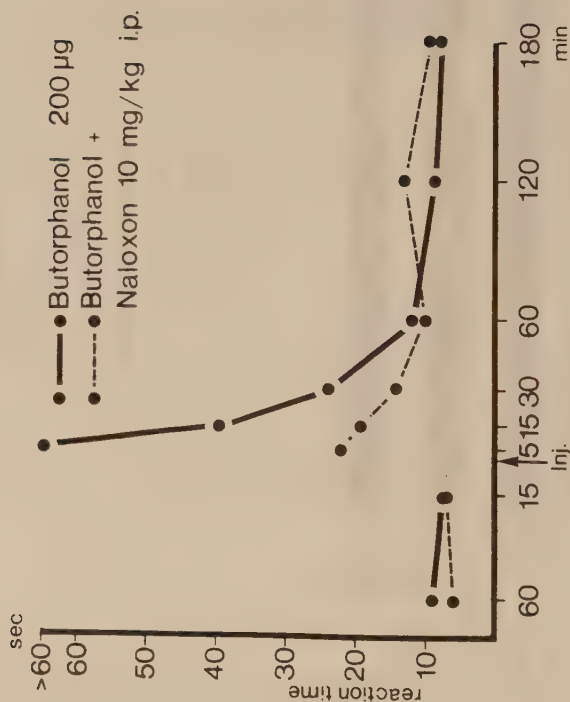


Abb. 11 + 12

Kontrolle: 0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.

B	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 10 µg/ 5 µl Butorphanol i. ventr.
HB	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 10 µg/10 µl Hydroxybutorphanol i.ventr.
HB HCL	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 10 µg/10 µl Hydroxybutorphanol HCL i.ventr.
NB HCL	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.o.+ 10 µg/10 µl Norbutorphanol HCL i.ventr.

intraventr.



writhing test (rat)

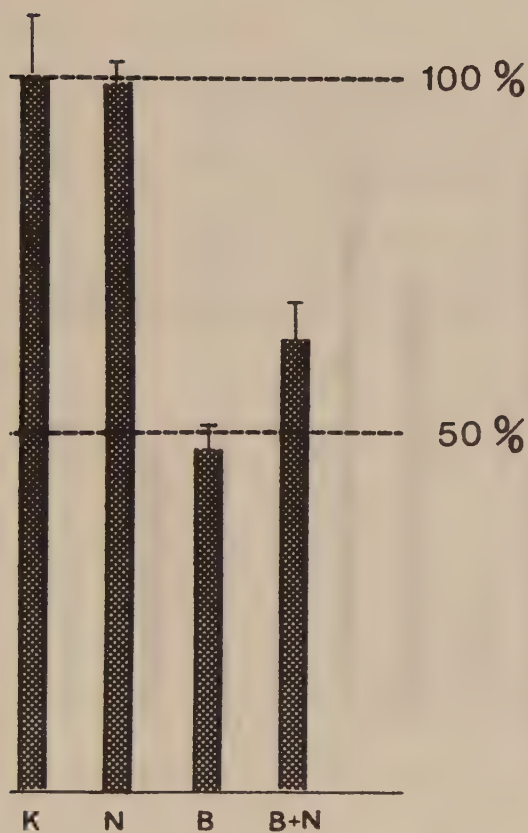


Abb. 14

Kontrolle: 0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p.

N 0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p.+ 1,25 mg/kg Naloxon s.c.

B 0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p.+10 µg/ 5 µl Butorphanol i.ventr.

B + N 0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p.+ Naloxon s.c.+ Butorphanol i.ventr.

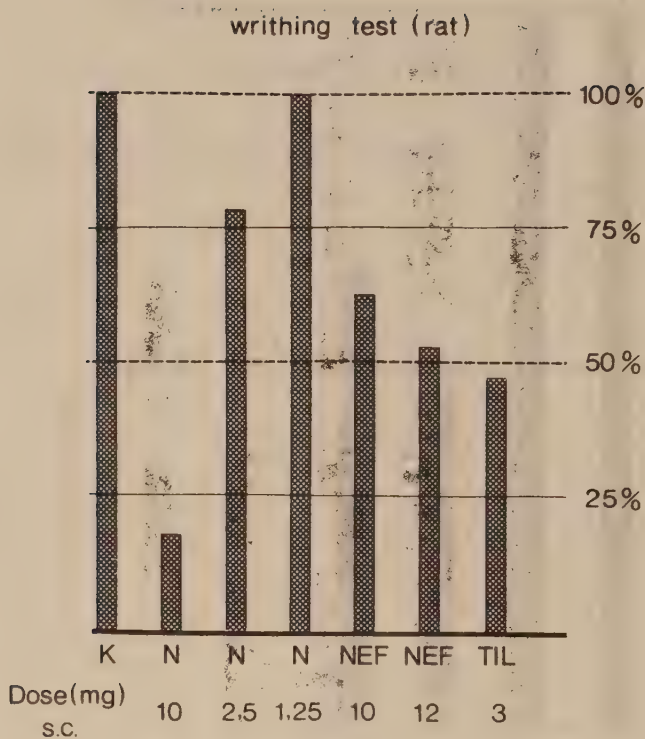
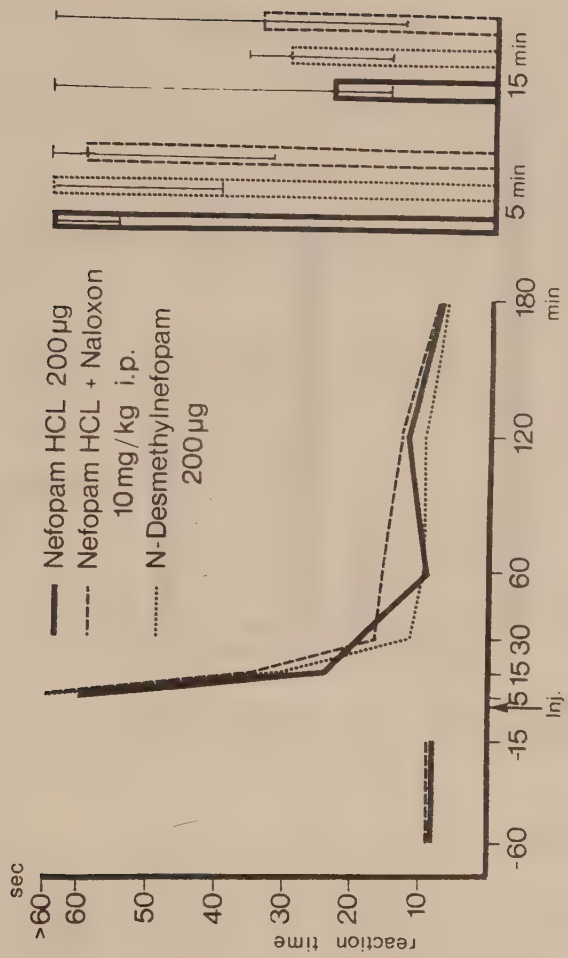


Abb. 15

Kontrolle:		0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p.	
N	10	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p. + 10	mg/kg Naloxon s.c.
N	2,5	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p. + 2,5	mg/kg Naloxon s.c.
N	1,25	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p. + 1,25	mg/kg Naloxon s.c.
NEF	10	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p. + 10	mg/kg Nefopam s.c.
NEF	12	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p. + 12	mg/kg Nefopam s.c.
Til	3	0,2 mg/150 g Phenylchinon i.p. + 3	mg/kg Tilidin s.c.

intravenr.



writhing test (rat)

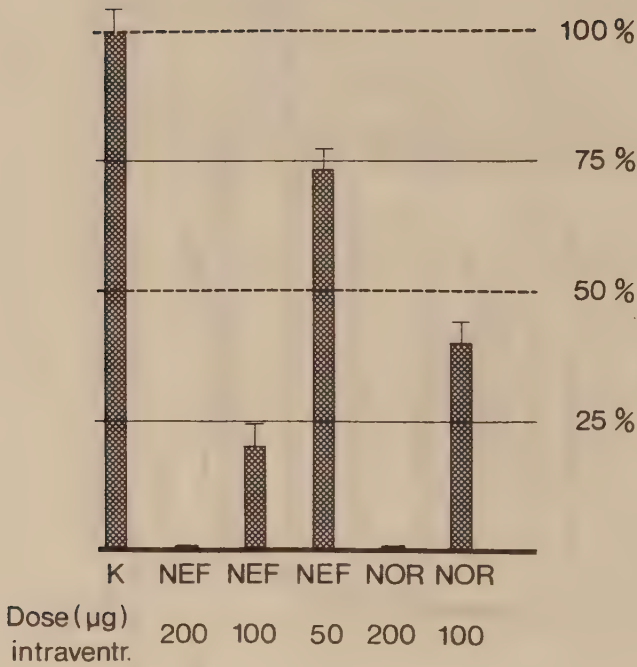


Abb. 18

Kontrolle: 0,2 mg/ 150 µ Phenylchinon i.o.

NEF 200	0,2 mg/ 150 µ Phenylchinon i.o.+ 200 µg/10 µl Nefopam i. ventr.
NEF 100	0,2 mg/ 150 µ Phenylchinon i.o.+ 100 µg/10 µl Nefopam i. ventr.
NEF 50	0,2 mg/ 150 µ Phenylchinon i.o.+ 50 µg/10 µl Nefopam i. ventr.
NOR 200	0,2 mg/ 150 µ Phenylchinon i.o.+ 200 µg/10 µl N-desmethyl Nefopam
NOR 100	0,2 mg/ 150 µ Phenylchinon i.o.+ 100 µg/10 µl N-desmethyl-Nefopam

Literatur:

1. Atweh, S.F. and Kuhar, M.J.
Autoradiographic Localisation of opiate receptors in rat brain.
III. The Telencephalon.
Brain Res. 134, 393-405 (1977)
2. Blumberg, H., Wolf, P.S. Dayton, H.B.
Use of Writhing-Test for Evaluating Analgesic Activity
of Narcotic Antagonists.
Proc.Soc.Exptl. Biol. Med. 118, 763-766 (1965)
3. Brakkee, J.H., Wiegant, V.M. and Gipsen, W.H.
A simple technique for rapid implantation of a permanent
cannula into the rat brain ventricular system.
Laboratory Animal Science 29, 78-81 (1979)
4. Campos, V.M., Solis, E. L.
The Analgesic and Hypothermic Effects of Nefopam,
Morphine, Aspirin, Diphenhydramine and Placebo.
J.Clin. Pharmacol. 20, 42-49 (1980)
5. Caruso, F.S., Pircio, A.W., Madisoo, H., Smyth, R.D. and
Pachter, J.J.
"Butorphanol" in: Goldbert, M.E. (ed.) Pharmacological and
Biochemical Properties of Drug Substances, Vol. 2
American Pharmaceutical Association, Academy of Pharmaceutical
Sciences, Washington, D.C. pp 19-57 (1979)
6. Cohen, A., Hernandez, C.M.
Nefopam Hydrochloride: New Analgesic Agent.
Journal of International Medical Research
4, 138-143 (1976)
7. Collier, H.D. J., Schneider, C.
Profiles of Activity in Rodents of Some Narcotic
and Narcotic Antagonist Drugs.
Nature 224, 610-612 (1969)
8. Conway, A.C., Michel, C.L.
Analgesic studies with Nefopam Hydrochloride
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 226, 156-171 (1977)

9. Ernst, L., Untersuchungen über die analgetische
Wirksamkeit von Tilidin und Pethidin sowie ihrer
Hauptmetabolite.
Dissertationsarbeit an den med. Fachbereichen
der FU Berlin (1981)

10. Gaver, R.C., Vasiljev, M., Wong, H., Monkovic, J.,
Swigor, J.E., Van Harken, D.R. and Smyth, R.D.
Disposition of Parenteral Butorphanols in Man.
Drug Metab. Dispos. 8. 230-235. (1980)

11. Harris, R.A.
Interactions between Narcotic Agonists Partial Agonists
and Antagonists evaluated by Schedule-Controlled Behavior.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
213, No.8 497-503, (1980)

12. Heel, R.C., Brogden, R.N., Speight, T.M., Avery, G.S.
Butorphanol: A Review of its Pharmacological Properties
and Therapeutic Efficacy
Drugs 16, 473-552 (1978)

13. Heel, R.C., Brogden, R.N., Pakes, G.E., Speight, T.M.
Avery, G.S.
Nefopam: A Review of its Pharmacological Properties
and Therapeutic Efficacy.
Drugs 19, 249-267. (1980)

14. Herz, A. Teschemacher, H.J.
Activities and sites of antinociceptive action of
morphine-like Analgesic and Kinetics of distribution
following intravenous, intercerebral and interventricular
application.
Adv. in Drug Res., 6, 79-119 (1971)

15. Jaquet, V.F., Lajtha, A.
Morphine actions at central nervous sites in rat.
Analgesia and hyperalgesia depending on site and
dose.
Science 182 (11) 490-492 (1973)

16. Leander, J.D.
 Vedence that nalorphine, butorphanol and oxilorphan are
 partial agonist at a kappa-opioid receptor.
 Eur. J. Pharmacol. 86, 467-470 (1983)
17. Levy, R.A. Proudfit, H.K.
 Analgesia produced by microinjections of Baclofen
 an Morphine at brain stem sites.
 Europ. J. of Pharmacol. 57, 43-57 (1979)
18. Lewis, J.R.
 Evaluation if New Analgesics
 Butorphanol and Nalorphine.
 JAMA 243, 1465-1467 (1980)
19. Paakkari, J.
 A.Simple Method for the verification of a successful
 cannulation of the cerebral ventricles.
 Experientia 36, 887-880 (1980)
20. Piercey, M.F.; Schroeder, L.A.
 Spinal and supraspinal sites for morphine and nefopam
 analgesia in the mouse.
 Eur. J. of Pharmacol. 74, 135-140 (1981)
21. Pircio, A.W., Buyniski, J.P., Roebel, L.E.
 Pharmacological Effects of a Combination of
 Butorphanol and Acetaminophen.
 Arch. Int. Pharmacodyn. 235, 116-123 (1978)
22. Watanabe, H.
 The development of tolerance and physical
 dependace of morphine following intraventricular
 injection in the rat.
 Jap. J. Pharmacol. 21, 283-389 (1971)
23. Wilcox, R.E. Bozarth, M. Levitt, R.A.
 Reversal of Morphine-Induced Catalepsy by Naloxone Microin-
 jections into Brain Regions with high opiate receptor bin-
 ding.
 Pharmacology, Biochemistry and Behaviour 18, 51-54 (1983)

24. Wood, P.L., Sanschagrin, D., Richard, J.W., Thakur, M.
Multiple opiate receptor affinities of Kappa and Agonist/
antagonist analgesics: In vivo assessment.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
226, No 2 545-550

(1983)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle sage ich allen, die mir bei
der Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur
Seite standen, meinen

herzlichen Dank.

Lebenslauf

Am 28. Januar 1952 wurde ich, Hans-Joachim Wolfgang KIRCHHERR, als Sohn von Hans Kirchherr und seiner Ehefrau Ingeborg, geborene Hellwig, in Berlin-Wilmersdorf geboren.

Nach vierjährigem Besuch der 5. Grundschule in Berlin-Wilmersdorf wechselte ich Ostern 1962 auf das Schiller-Gymnasium in Berlin-Charlottenburg, wo ich im Januar 1971 das Abitur bestand.

Vom 1. Februar 1971 bis Ende August 1972 arbeitete ich in der Chirurgischen Abteilung des Klinikums Charlottenburg im Pflegebereich.

Im Wintersemester 1972/73 nahm ich dann das Studium an der Freien Universität Berlin auf, zunächst im Fach Chemie. Bereits im folgenden Sommersemester begann ich dann mit dem Medizinstudium, welches ich im Juni 1980 mit der Erlangung der Approbation als Arzt abschloß.

Anschließend arbeitete ich im Institut für Arzneimittel des Bundesgesundheitsamtes bei Herrn Prof. CHRIST an der hier vorliegenden Untersuchung.

Seit dem 1. Juli 1981 arbeite ich in der Inneren Abteilung des Dominikus-Krankenhauses in Berlin-Hermsdorf.

Ich bin seit 1975 verheiratet und habe zwei Töchter, die 1977 und 1980 geboren wurden.

